

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 385**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2008 E 08707646 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2109457**

54 Título: **Aplicación terapéutica de inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal**

30 Prioridad:

12.02.2007 EP 07002903

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.04.2016

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**SCHULTE, STEFAN;
KRONTHALER, ULRICH;
SCHMIDBAUER, STEFAN;
WEIMER, THOMAS y
HOFMANN, KAY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 385 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aplicación terapéutica de inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal

El objeto de la presente invención es, en el aspecto más general, la aplicación terapéutica del inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal, infestina, o dominios del mismo o inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados basados en homólogos de infestina, que previenen la formación y/o la estabilización de trombos arteriales o venosos tridimensionales, interfiriendo con las proteínas implicadas en la activación de la llamada vía de coagulación intrínseca. En particular, la presente invención se refiere al uso de dichos inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal o de fragmentos de los mismos o inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados, en el tratamiento o la profilaxis de una afección o trastorno relacionado con la formación de trombos arteriales, es decir, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio, inflamación, activación del complemento, fibrinólisis, angiogénesis y/o enfermedades relacionadas con la formación de cinina patológica, tales como choque hipotónico, edema incluyendo el angioedema hereditario, infecciones bacterianas, artritis, pancreatitis o gota articular, coagulación intravascular diseminada (CID) y septicemia.

La lesión de la pared vascular desencadena una adhesión súbita y agregación de plaquetas de la sangre, seguida por la activación del sistema de coagulación del plasma y la formación de trombos que contienen fibrina, que bloquean el sitio de la lesión. Estos eventos son cruciales para limitar la pérdida de sangre post-traumática, pero también pueden ocluir vasos enfermos, lo que conduce a una isquemia e infarto de órganos vitales. En el modelo de cascada, la coagulación de la sangre tiene lugar a través de una serie de reacciones que implican la activación de zimógenos por proteólisis limitada que culmina en la generación de trombina, que convierte el fibrinógeno del plasma en fibrina y activa las plaquetas. A su vez, las plaquetas que se adhieren a colágeno o a fibrina facilitan la generación de trombina en varios órdenes de magnitud a través de la exposición de fosfolípidos procoagulantes (principalmente fosfatidilserina) en su superficie exterior, lo que propaga el ensamblado y la activación de complejos de proteasas de la coagulación y mediante la interacción directa entre receptores plaquetarios y factores de coagulación.

Existen dos vías convergentes para la coagulación que se activan por un componente extrínseco (pared del vaso) o intrínseco (transmitido por la sangre) del sistema vascular. La vía "extrínseca" se inicia a través del complejo del factor VII plasmático (FVII) con el factor tisular (FT) que es una proteína integral de la membrana, un cofactor esencial de la coagulación que está ausente de la superficie luminal pero que se expresa fuertemente en las capas subendoteliales de los vasos y que es accesible o se libera a través de una lesión tisular. El FT expresado en microvesículas circulantes también puede contribuir a la propagación de trombos manteniendo la generación de trombina en la superficie de plaquetas activadas.

La vía de activación "intrínseca" o por contacto se inicia cuando el factor XII (FXII, factor de Hageman) se pone en contacto con superficies cargadas negativamente en una reacción que implica cininógeno de alto peso molecular y calicreína plasmática. FXII se puede activar con constituyentes macromoleculares de la matriz subendotelial, tales como glicosaminoglicanos y colágenos, sulfátidos, nucleótidos y otros polianiones solubles o material no fisiológico tal como vidrio o polímeros. Uno de los activadores por contacto más potentes es el caolín y esta reacción sirve como mecanismo base para el principal ensayo clínico de la coagulación, el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), que mide la capacidad de coagulación a través de la vía "intrínseca". En las reacciones propagadas por plaquetas, el FXII activado activa después el FXI a FXIa y posteriormente el FXIa activa el factor IX. El complejo de FVIIa, cuyo FVIIIa ha sido activado previamente por trazas de FXa y/o trombina y FIXa (el complejo tenasa), activa posteriormente el FX (véase la figura 1, "brazo izquierdo"). A pesar de su alta potencia para inducir una coagulación de la sangre *in vitro*, la importancia (patofisiológica) de la vía de coagulación intrínseca inducida con FXII, está cuestionada por el hecho de que carencias hereditarias de FXII, así como cininógeno y calicreína plasmática de alto peso molecular no están asociados con complicaciones hemorrágicas. Junto con la observación de que los seres humanos y los ratones que carecen de componentes de la vía extrínseca, tales como FT y FVII, padecen hemorragia grave, esto ha llevado a la hipótesis actual de que para detener una hemorragia *in vivo* se requiere exclusivamente la cascada extrínseca (Mackman, N. 2004. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 1015-1022).

En afecciones patológicas, la cascada de la coagulación se puede activar de manera inapropiada lo que después da como resultado la formación de tapones hemostáticos en el interior de los vasos sanguíneos. De esta manera, los vasos pueden estar ocluidos y el suministro de sangre a los órganos distales, limitado. Este proceso se conoce como tromboembolismo y se asocia con una mortalidad elevada. Además, el uso de dispositivos protésicos, que entran en contacto con la sangre, está gravemente limitado debido a la activación de la cascada de la coagulación intrínseca. Un recubrimiento adecuado de la superficie protésica puede evitar dicho problema en algunos casos, pero puede comprometer su función en otros. Ejemplos de tales dispositivos protésicos son hemodializadores, circuitos de derivación cardiopulmonar, válvulas cardíacas, endoprótesis vasculares y catéteres permanentes. En los casos en los que se utilizan tales dispositivos, se administran anticoagulantes tales como heparina para prevenir la formación de fibrina en la superficie. Sin embargo, algunos pacientes no toleran la heparina, lo que puede causar trombocitopenia inducida por heparina (HIT) que produce una agregación plaquetaria y trombosis potencialmente mortal. Además, una desventaja inherente de todos los anticoagulantes utilizados en las clínicas es un mayor riesgo de eventos hemorrágicos graves. Por lo tanto, existe una gran necesidad de nuevos tipos de anticoagulantes que no estén asociados con este tipo de complicaciones y que se puedan utilizar en pacientes afectados o como un concepto de terapia

superior que previene la trombosis sin un aumento de los riesgos de hemorragia (Renne T et al. 2005. Defective thrombus formation in mice lacking factor XII. J. Exp. Med. 202:271-281).

En el documento WO2006/066878 se propone el uso de anticuerpos contra FXII/FXIIa o el uso de inhibidores de FXII/FXIIa. Como inhibidores potenciales se ha propuesto la antitrombina III (AT III), el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, el inhibidor de C1, la aprotinina, el inhibidor de la proteasa alfa-1, la antipaína ([[(S)-1-carboxi-2-feniletil]-carbamoil-L-Arg-L-Val-Arginal), acetato de Z-Pro-Pro-aldehído-dimetilo, DX88 (Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; citado en: Williams A y Baird LG.2003. DX-88 and HAE: a developmental perspective. Transfus Apheresis Sci. 29:255-258), la leupeptina, los inhibidores de la prolil oligopeptidasa tales como Fmoc-Ala-Pyr-CN, el inhibidor de la tripsina de maíz, mutantes del inhibidor de la tripsina pancreática bovina, la proteína anticoagulante de *Limanda aspera*, el inhibidor V de la tripsina de *Cucurbita maxima* que incluye isoinhibidores y Hamadarina (como describen Isawa H et al. 2002. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. J. Biol. Chem. 277:27651-27658).

Un inhibidor ideal de FXII/FXIIa como agente terapéutico - aunque muestra una alta actividad inhibidora frente a FXII/FXIIa - no incrementará el riesgo de hemorragia, no será inmunógeno y se tendrá que administrar con la mayor moderación posible, idealmente solo una vez. Los inhibidores de molécula pequeña, como el acetato de Z-Pro-Pro-aldehído-dimetilo, solo tendrán una semivida muy corta después de la administración lo que requiere inyecciones múltiples o se tendrán que desarrollar como formas de liberación lenta disponibles oralmente y después administrarlos también constantemente durante un largo período de tiempo. Las proteínas plasmáticas humanas como el inhibidor de C1, a primera vista cumplirían con todos los requisitos, porque tienen una actividad inhibidora relativamente alta de FXII/FXIIa a la vez que no aumentan el riesgo de hemorragia, siendo no inmunógenas como proteínas humanas y teniendo también una semivida considerablemente larga en el plasma.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente en un modelo *in vivo*, que el inhibidor de la trombogenicidad de C1 como candidato principal para inhibidor de FXII/FXIIa humano, no se podría utilizar con éxito para evitar la oclusión. Otro inhibidor propuesto para FXII/FXIIa procedente del plasma humano, a saber, el inhibidor de AT III, por lo menos no cumpliría con el segundo requisito ya que el riesgo de hemorragia aumentaría utilizándolo como inhibidor de FXII/FXIIa (Warren BL et al. 2001. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. JAMA 286:1869-1878).

Por lo tanto, es evidente que todavía existe una necesidad de una medicación mejorada para el tratamiento y/o la profilaxis de la trombosis y de trastornos similares. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención satisfacer tal necesidad.

Durante más de cinco décadas se ha sabido que la carencia de factor de coagulación XII no está asociada con un aumento espontáneo o relacionado con lesiones de las complicaciones de la hemorragia (Ratnoff OD & Colopy JE 1955. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. J Clin Invest 34:602-613). De hecho, aunque se ha detectado fácilmente a través de un valor patológico medido en el TTPa (un ensayo clínico de coagulación que se dirige a la vía intrínseca de la coagulación) los seres humanos que carecen de FXII no padecen una hemorragia anormal, incluso durante procedimientos quirúrgicos mayores (Colman RW. Hemostasis and Thrombosis. Basic principles & clinical practice (compiladores Colman RW, Hirsch J, Mader VJ, Clowes AW, & George J) 103-122 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001)). Por el contrario, la carencia de FXII se había asociado con un mayor riesgo de trombosis venosa (Kuhli C et al. 2004. Factor XII deficiency: a thrombophilic risk factor for retinal vein occlusion. Am. J. Ophthalmol. 137:459-464; Halbmayer WM et al. 1993. Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of FXII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction. Wien. Med. Wochenschr. 143:43-50). Estudios e informes de casos que apoyan esta idea se refieren al caso inicial de carencia de FXII, el Sr. John Hageman, que murió de una embolia pulmonar. La hipótesis de que la carencia de FXII está asociada con un mayor riesgo protrombótico está cuestionada por una reevaluación reciente de varios informes de casos, cuyos informes originales relacionaban una carencia de FXII con trombosis (Girolami A et al. 2004. The occasional venous thromboses seen in patients with severe (homozygous) FXII deficiency are probably due to associated risk factors: A study of prevalence in 21 patients and review of the literature. J. Thromb. Thrombolysis 17:139-143). En la mayoría de los casos, los autores identificaron factores de riesgo protrombótico concomitantes, congénitos o adquiridos en combinación con una carencia de factor FXII que podría ser responsable del evento trombótico, independientemente de FXII. Estudios epidemiológicos más amplios que utilizaban pacientes bien caracterizados (Koster T et al. 1994. John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden thrombophilia Study. Br. J. Haematol. 87:422-424) y familias que carecían de FXII (Zeerleder S et al. 1999. Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency - a study on 73 subjects from 14 Swiss families. Thromb. Haemost. 82:1240-1246) indicaban que no existe una correlación entre la carencia de FXII y cualquier riesgo protrombótico o antitrombótico.

Sorprendentemente y en contraste con la creencia común de los expertos en la técnica, se ha descubierto que la vía de coagulación intrínseca impulsada por el factor XII está implicada en la formación de trombos arteriales *in vivo* pero no es necesaria para la hemostasia específica de tejido normal (Kleinschnitz C et al. 2006. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. J. Exp. Med. 203:513-518; documento WO 2006/066878). Inesperadamente, estos resultados sitúan al factor XII en una posición central en el proceso de formación de trombos patológicos (Figura 1). Por consiguiente, las sustan-

cias capaces de interferir y bloquear la activación de FXII o la actividad de FXIIa pueden ser adecuadas para bloquear la formación patógena de trombos arteriales y sus consecuencias clínicas.

Recientemente, se ha descubierto un nuevo inhibidor de FXII/FXIIa en insectos: los dominios 3-4 de infestina (infestina 3-4) y el dominio 4 de infestina (infestina-4) del intestino medio de *Triatoma infestans*, un insecto hematófago (Campos ITN et al. 2002. Infestin, a thrombin inhibitor present in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:991-997; Campos ITN et al. 2004. Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Lett.* 577:512-516). Estas proteínas se conocen como inhibidores potentes de FXIIa de los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal, que prolongan el tiempo de tromboplastina parcial por un factor de aproximadamente 3.

Estos inhibidores no se han evaluado en términos de aplicación terapéutica para el bloqueo de la formación de trombos patógenos. Además, tampoco se ha tratado de reducir la inmunogenicidad de estos inhibidores heterólogos en los seres humanos y de extender su semivida *in vivo*.

Se encontró sorprendentemente que el dominio inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal, infestina-4, protegía a los ratones contra la formación de trombos patógenos, aunque no se observó un aumento del riesgo de hemorragia en estos animales. Para aumentar la semivida plasmática, la infestina-4 se expresó como una fusión con albúmina humana en células de mamífero y se purificó a partir del material sobrenadante de un cultivo celular. El inhibidor purificado se inyectó en ratones y se indujo una estimulación trombótica con la ayuda de FeCl_3 . El 100% de los ratones tratados con rHA-infestina-4 estaban protegidos, mientras que en la gran mayoría de los ratones control sin tratar, tuvo lugar una oclusión de los vasos. La falta de riesgo asociado de hemorragia se demuestra mediante experimentos de recorte de la cola. Ratones tratados con infestina-4, así como ratones control sin tratar muestran un tiempo de hemostasia y pérdida de sangre comparables. Por lo tanto, la protección *in vivo* contra la trombosis en combinación con un riesgo de hemorragia insignificante se demuestra para la infestina-4 recombinante en ratones. La infestina 3-4 en este sentido está comprendida dentro del término infestina-4, pero el compuesto preferido es infestina-4 o mezclas de infestina 3-4 con predominio de infestina-4.

La rHA-infestina-4 también se sometió a ensayo *in vitro* para estudiar su potencial para inhibir específicamente la vía intrínseca, midiendo el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), que, en consonancia con una sustancia que inhibe eficazmente la vía intrínseca, de hecho se prolonga. En contraste, el tiempo de protrombina (TP), una prueba para la activación iniciada con el factor VI/factor tisular de la vía extrínseca de la coagulación, casi no estaba afectado. La reducción de la actividad de FXII también se demostró directamente basándose en plasma humano que carecía de FXII. Por consiguiente, el objeto de la invención es el uso del inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal, infestina, o fragmentos del mismo, preferentemente el dominio 3-4, más preferido el dominio 4, o fragmentos de los mismos como un medicamento, más específicamente para la preparación de un medicamento contra enfermedades trombóticas que prolonga el TTPa (dejando esencialmente sin afectar el TP) y que evita de este modo la formación y/o la estabilización de los trombos arteriales o venosos tridimensionales, sin riesgo de hemorragia concomitante. El inhibidor respectivo puede actuar por tanto para inhibir la vía intrínseca de la coagulación, especialmente la actividad de FXIIa, para inhibir la formación y/o la estabilización de trombos arteriales o venosos tridimensionales.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además una sustancia farmacéutica respectiva para el tratamiento o la profilaxis de una afección o un trastorno relacionado con la formación de trombos arteriales, es decir, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio. Debido a las múltiples funciones efectoras de FXIIa, la sustancia farmacéutica respectiva tiene un efecto terapéutico adicional sobre la activación del complemento, la fibrinólisis, la inflamación, la angiogénesis y/o enfermedades relacionadas con la formación de cinina patológica, tales como choque hipotónico, edema incluyendo angioedema hereditario, infecciones bacterianas, artritis, pancreatitis o gota articular, coagulación intravascular diseminada (CID) y sepsis.

Inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados

La administración terapéutica de inhibidores heterólogos tales como infestina-4 a los seres humanos, puede generar una respuesta inmune. Por lo tanto, otro objetivo de esta invención era identificar inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal menos inmunógenos, pero todavía potentes. Se encontró sorprendentemente que mediante la modificación de un inhibidor relacionado de la proteasa de serina de tipo Kazal humana (inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal 1, SPINK-1) de manera que el sitio(s) de contacto putativo con la enzima se sustituye por las regiones correspondientes de infestina-4, se generaban inhibidores de FXIIa altamente activos que se pueden utilizar para la preparación de sustancias, especialmente para el tratamiento o la prevención de eventos trombóticos. Basándose en estos resultados, es posible modificar cualquier inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal natural de manera que se convierte en específico de FXIIa. Un ejemplo se describe en la siguiente sección.

Con el fin de generar un inhibidor de FXIIa potente para uso terapéutico en los seres humanos, buscamos una proteína humana con una alta similitud con la infestina-4, que debía ser menos inmunógena en pacientes humanos que una proteína obtenida a partir de insectos. La proteína humana con mayor similitud a la infestina-4 se encontró que era SPINK-1, un inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal expresado en el páncreas (también conocido como

inhibidor de la tripsina secretora pancreática, PSTI). Las similitudes entre la infestina-4 y SPINK-1 se resumen en la Figura 2.

Los documentos EP 0 352 089 A2, WO 88/03171 A1 y EP 0 278 112 A2 describen mutantes del inhibidor de la tripsina secretora pancreática humana (PSTI o SPINK-1) y su uso como inhibidores terapéuticos de la tripsina y en el tratamiento de la pancreatitis, así como métodos para producir estos mutantes por medios recombinantes.

Basándose en la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre, se han generado diferentes mutantes con mayor homología de la secuencia de SPINK-1 con la de infestina-4. Como no se disponía de datos estructurales para la infestina, se analizaron datos de un inhibidor relacionado, procedentes de *Rhodnius prolixus* en un complejo con trombina (PDB: 1TBQ). El inhibidor de *R. prolixus* tiene dos dominios Kazal, el extremo N-terminal que interacciona con los residuos catalíticos de la trombina. Por tanto, el dominio N-terminal se utilizó como base para la comparación con infestina-4. La Figura 3 muestra los sitios de contacto del inhibidor de *R. prolixus* con trombina y los sitios de contacto de SPINK-1 con quimotripsina. Una característica común de ambos inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal es la acumulación de sitios de contacto en la región N-terminal. Suponiendo que esta región transmite la especificidad de la inhibición, se generaron varios mutantes de SPINK-1. Para el primer mutante, llamado K1, el sitio de contacto supuesto para la proteasa en la parte amino-terminal de SPINK-1, fue reemplazado por el de infestina-4. Otros intercambios de aminoácidos en los mutantes K2 y K3 se realizaron cambiando SPINK-1 cada más cerca de la secuencia de infestina-4. La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de estos mutantes y el grado de cambios en la secuencia de tipo silvestre de SPINK-1. Las secuencias de aminoácidos de la proteína madura de tipo silvestre SPINK-1, de los tres mutantes y de infestina-4 se proporcionan como SEQ ID NO 1 a 5. La expresión "mutantes de SPINK-1 con un aumento de la homología respectiva incrementada" significa mutantes que tienen más de 20 aminoácidos idénticos a la infestina-4, o una sustitución conservadora en lugar de la identidad, lo que significa una sustitución conservadora en lugar de un aminoácido idéntico. Estos mutantes son diferentes de los mutantes del inhibidor de la tripsina secretora pancreática humana descritos en los documentos EP-A2-0352089, WO88/03171A y EP-A2-0278112.

Los mutantes de SPINK-1 se expresaron y se purificaron. Los mutantes se sometieron a ensayo *in vitro* para estudiar su potencial para inhibir específicamente la vía intrínseca, midiendo el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), que se prolongaba tal y como se esperaba en el caso de una sustancia capaz de inhibir la vía intrínseca. En contraste, el tiempo de protrombina (TP), una prueba para la activación iniciada con el factor VIIa/factor tisular de la vía extrínseca de la coagulación, no estaba esencialmente afectado.

Por consiguiente, otra realización de la invención es el uso de una forma modificada del inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal de mamífero SPINK-1, de homólogos de infestina o de fragmentos de los mismos, o preferiblemente del dominio 4 de la infestina o de fragmentos y homólogos del mismo, como un producto farmacéutico, más específicamente para la preparación de un producto farmacéutico contra las enfermedades trombóticas. El modo de acción en estas indicaciones es la inhibición de la actividad de FXII/FXIIa que se puede medir por el TTPa que se prolonga (dejando el TP esencialmente sin afectar). De esta manera, se evita la formación y/o la estabilización de los trombos arteriales o venosos tridimensionales. El inhibidor respectivo puede actuar por tanto como un inhibidor de la vía intrínseca de la coagulación, especialmente de la actividad de FXIIa, en lo que respecta a inhibir la formación y/o la estabilización de trombos arteriales o venosos tridimensionales.

Por lo tanto, la presente invención proporciona, además, sustancias con un menor riesgo de inmunogenicidad en los seres humanos, para el tratamiento o la profilaxis de una afección o un trastorno relacionado con la formación de trombos arteriales, es decir, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio, activación del complemento, fibrinólisis, inflamación, angiogénesis y/o enfermedades relacionadas con la formación de cinina patológica, tales como choque hipotónico, edema incluyendo angioedema hereditario, infecciones bacterianas, cáncer (síndrome de Trousseau), artritis, pancreatitis o gota articular, coagulación intravascular diseminada (CID) o sepsis.

Las proteínas de la invención son mutantes obtenidos a partir del inhibidor de la proteasa del páncreas humano SPINK-1, tal y como se ha descrito anteriormente, en donde tales mutantes se caracterizan porque han sido modificados para aumentar su homología con la proteína infestina-4 con respecto a la capacidad para inhibir la actividad de FXIIa. Tales mutantes se caracterizan porque prolongan el tiempo de tromboplastina parcial activada *in vitro*.

Inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal de mamífero modificados e inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados con semividas prolongadas

Otro aspecto de la invención son los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal de mamífero modificados, basados en homólogos de infestina o fragmentos de los mismos con una semivida prolongada. Como los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal de la invención son proteínas más pequeñas, se puede esperar un aclaramiento renal rápido según lo publicado para otras proteínas pequeñas (Werle M. y Bernkop-Schnurch A. 2006. Strategies to improve plasma half-life time of peptide and protein drugs. Amino Acids 30:351-367). Una manera de hacer frente a una semivida corta en plasma de un compuesto polipeptídico es, por supuesto, inyectarlo repetidamente o mediante infusión continua. Preferiblemente, la semivida plasmática intrínseca del propio polipéptido se incrementa. Por tanto, otro aspecto de la invención es proporcionar inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal fusionados a proteínas que prolongan la semivida (HLEP).

Un "polipéptido que mejora la semivida" (HLEP) tal y como se emplea en el presente documento, se selecciona entre el grupo que consiste en albúmina, un miembro de la familia de la albúmina, la región constante de la inmunoglobulina G y fragmentos de la misma y polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a la albúmina, a miembros de la familia de la albúmina, así como a porciones de una región constante de una inmunoglobulina.

- 5 Como ejemplos específicos de polipéptidos que mejoran la semivida (HLEPs) se han descrito la albúmina e inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados.

Ballance et al. (documento WO 01/79271) describieron polipéptidos de fusión de una multitud de diferentes polipéptidos terapéuticos que, cuando se fusionaban a la albúmina de suero humano, se pronosticaba que tendrían una semivida funcional *in vivo* incrementada y una vida útil prolongada. La proteína terapéutica se puede fusionar directamente o mediante un enlazador peptídico a la fracción de albúmina, y se describen fusiones C-terminales y N-terminales.

10 Las expresiones albúmina de suero humano (HSA) y albúmina humana (HA) se utilizan indistintamente en esta solicitud. Los términos "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplios, y abarcan albúmina de suero humano (y fragmentos y variantes de la misma), así como albúminas de otras especies (y fragmentos y variantes de las mismas).

15 Tal y como se emplea en este documento, "albúmina" se refiere colectivamente a un polipéptido de albúmina o a una secuencia de aminoácidos, o a un fragmento o una variante de la albúmina, que tiene una o varias actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o a fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de la albúmina humana tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 en el presente documento o albúminas de otros vertebrados o fragmentos de las mismas, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

20 La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la longitud completa de la secuencia de HA tal y como se ha descrito anteriormente, o puede incluir uno o varios fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de HA o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de HA.

25 La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede ser una variante de la HA normal. La porción de polipéptido terapéutico de las proteínas de fusión de la invención también puede ser una variante de los polipéptidos terapéuticos correspondientes, tal y como se describe en el presente documento. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, en donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o el dominio activo, que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos terapéuticos.

30 En particular, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de la albúmina humana y fragmentos de la albúmina humana. La albúmina se puede obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas de animales no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, las que se obtienen a partir de gallina y salmón. La porción de albúmina del polipéptido ligado a la albúmina puede ser de un animal diferente al de la porción de polipéptido terapéutico.

35 En términos generales, un fragmento o una variante de albúmina tendrá una longitud de al menos 20, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente más de 70 aminoácidos. La variante de albúmina puede consistir preferentemente o, alternativamente, comprender al menos un dominio completo de la albúmina o de fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO 6), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO 6), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO 6), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO 6), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO 6) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO 6 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO 6). Cada dominio se compone en sí mismo de dos subdominios homólogos, a saber, 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles entre los subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

La porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención puede comprender al menos un subdominio o un dominio de HA o modificaciones conservadoras de los mismos.

40 Además de la albúmina, la alfafetoproteína, otro miembro de la familia de la albúmina, se ha afirmado que prolonga la semivida de un polipéptido terapéutico unido (documento WO 2005/024044). La familia de proteínas de la albúmina, proteínas de transporte sérico relacionadas evolutivamente, consiste en albúmina, alfafetoproteína (AFP; Beattie & Dugaiczky 1982. Structure and evolution of human alpha-fetoprotein deduced from partial sequence of cloned cDNA. Gene 20:415-422), afamina (AFM; Lichenstein et al. 1994. Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family. J. Biol. Chem. 269:18149-18154) y la proteína que se une a la vitamina D (DBP; Cooke & David 1985. Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and alpha-fetoprotein gene family. J. Clin. Invest. 76:2420-2424). Sus genes representan un grupo multigénico con similitudes estructurales y funcionales cartografiadas en la misma región cromosómica en los seres humanos, los ratones y las

ratas. La similitud estructural de los miembros de la familia de la albúmina sugiere su utilidad como HLEPs. Por tanto, es otro objeto de la invención el uso de tales miembros de la familia de la albúmina, de sus fragmentos y variantes como HLEPs. El término "variantes" incluye inserciones, delecciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, en donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o el dominio activo, lo que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos terapéuticos.

Los miembros de la familia de la albúmina pueden comprender la longitud completa de la proteína respectiva AFP, AFM y DBP, o pueden incluir uno o varios fragmentos de las mismas que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de la proteína respectiva o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de la proteína respectiva.

Las proteínas de fusión de los miembros de la familia de la albúmina de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de AFP, AFM y DBP. Las proteínas se pueden obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo. Los miembros de la familia de la albúmina no mamíferos incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a los obtenidos a partir de gallina y salmón.

La IgG y los fragmentos de IgG sin un dominio de unión a antígeno también se pueden utilizar como HLEPs. La porción de polipéptido terapéutico está conectada a la IgG o a los fragmentos de IgG, preferiblemente a través de la región bisagra del anticuerpo o un enlazador peptídico, que incluso puede ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patente describen la fusión de proteínas terapéuticas con regiones constantes de inmunoglobulina para prolongar las semividas *in vivo* de las proteínas terapéuticas. Los documentos US 2004/0087778 y WO 2005/001025 describen proteínas de fusión de dominios Fc o al menos de porciones de las regiones constantes de inmunoglobulina con péptidos biológicamente activos que aumentan la semivida del péptido, que de otro modo se degradaría rápidamente *in vivo*. Se ha descrito que las proteínas de fusión Fc-IFN- β han conseguido mejorar la actividad biológica, prolongar la semivida en circulación y una mayor solubilidad (documento WO 2006/000448). Las proteínas Fc-EPO con una semivida en suero prolongada y una mayor potencia *in vivo* han sido descritas (documento WO 2005/063808), así como fusiones de Fc con G-CSF (documento WO 2003/076567), péptido similar al glucagón-1 (documento WO 2005/000892), factores de coagulación (documento WO 2004/101740) e interleucina-10 (documento US 6.403.077), todas ellas con propiedades que prolongan la semivida.

Por tanto, otra realización de la invención es el uso de tales secuencias de inmunoglobulina, preferiblemente fragmentos Fc y variantes de los mismos como HLEPs. Inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados con especificidad inhibidora mejorada para FXIIa, como los mutantes SPINK-1, se pueden fusionar a dominios Fc o al menos a porciones de las regiones constantes de inmunoglobulina como HLEPs y ser expresados en células de *E. coli*, levadura, insecto, células vegetales o de vertebrados o en animales transgénicos. Una proteína de fusión SPINK-K2-Fc se muestra a modo de ejemplo en SEQ ID NO 25.

La invención se refiere específicamente a proteínas de fusión, que comprenden unir inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados, tal como mutantes de SPINK-1 o fragmentos o variantes de los mismos, al extremo N-terminal o C-terminal de una HLEP o de un fragmento o variante de la misma, de tal manera que la proteína de fusión formada tiene un incremento de la semivida *in vivo*, en comparación con el inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal correspondiente que no se ha unido a una HLEP. Un enlazador peptídico intercalado se puede introducir entre el polipéptido terapéutico y la HLEP. Si la HLEP interfiere con la actividad específica del polipéptido terapéutico, por ejemplo, mediante impedimento estérico, se pueden introducir enlazadores escindibles. Las enzimas preferidas para la escisión del enlazador son las proteasas de coagulación de la vía intrínseca de la coagulación, FXIIa, FXIa, FIXa, FVIIIa o FXa, en donde la enzima de escisión más preferida es FXIIa.

La familia de inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal es una de las numerosas familias de inhibidores de la proteasa de serina. Se han descrito muchas proteínas de diferentes especies (Laskowski M y Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem. 49: 593-626).

Dentro de la definición anterior, "infestina-4 e inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados" se hace referencia a polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos natural o SEQ ID 2 a 5 o 21 a 24.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal tal y como se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser ADN monocatenario o bicatenario, o ARN monocatenario o bicatenario. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "polinucleótido(s)" incluye también ADN o ARNs que comprenden una o varias bases modificadas y/o bases inusuales, tales como inosina. Se apreciará que se pueden realizar una serie de modificaciones en el ADN o ARN que sirven para muchos fines conocidos por el experto en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal y como se emplea en este documento, incluye tales formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas.

La persona experta comprenderá que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede estar codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" están incluidas en esta invención.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como y no limitadas a, otros ADN's y ARN's cromosómicos y extracromosómicos. Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula hospedadora. Los métodos de purificación convencionales de ácido nucleico, conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

Aún otro aspecto de la invención es un plásmido o un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el plásmido o el vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para uso en la terapia génica humana.

Todavía otro aspecto de la invención es una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la invención o un plásmido o un vector de la invención.

Las células hospedadoras de la invención se pueden emplear en un método para producir un inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal, que es parte de esta invención. El método comprende:

- cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones tales que el inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal se expresa; y
- opcionalmente recuperar el inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal a partir del medio de cultivo.

EXPRESIÓN DE LOS POLIPÉPTIDOS PROPUESTOS:

Los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal y los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados de la invención se pueden producir como moléculas recombinantes en células hospedadoras procariontas o eucariotas, tales como bacterias, levaduras, células vegetales, células animales (incluidos los insectos) o líneas celulares humanas o en animales transgénicos. Opcionalmente, los polipéptidos se secretan desde las células hospedadoras.

Expresión en líneas celulares animales o humanas

La producción de proteínas recombinantes a niveles elevados en células hospedadoras adecuadas requiere el ensamblado de los ADN's modificados mencionados anteriormente, en unidades transcripcionales eficaces junto con elementos reguladores adecuados en un vector de expresión recombinante que se puede propagar en diferentes sistemas de expresión, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores eficaces de la transcripción se podrían obtener a partir de células animales que tienen virus como hospedadores naturales o a partir del ADN cromosómico de células animales. Preferiblemente, se pueden emplear combinaciones de promotor-potenciador obtenidas a partir del virus de simio 40, adenovirus, virus del poliovirus BK, citomegalovirus humano o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes transcritos de forma constitutiva fuerte en células animales como betaactina o GRP78. Con el fin de lograr altos niveles estables de ARNm transcrito a partir de los ADN's, la unidad de transcripción debería contener en su parte 3'-proximal una región de ADN que codifique una secuencia de terminación de la transcripción-poliadenilación. Preferiblemente, esta secuencia se obtiene a partir de la región transcripcional temprana del virus de simio 40, del gen de la betaglobina de conejo o del gen activador del plasminógeno de tejido humano.

Los ADN's se transfectan a continuación a una línea de células hospedadoras adecuada para la expresión del polipéptido terapéutico. Ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células 293 de riñón embrionario humano y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADN's correspondientes se puede introducir de varias maneras diferentes. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes se pueden crear a partir de vectores basados en diferentes virus animales. Ejemplos de estos son vectores basados en baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y preferentemente virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADN's correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante, que puede actuar como un marcador seleccionable dominante en estas células, con el fin de facilitar el aislamiento de clones celulares específicos que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son la fosfotransferasa Tn5 de amino glicosido, que confiere resistencia a la geneticina (G418), la fosfotransferasa de higromicina, que confiere resistencia a la higromicina y la acetil transferasa de puromicina, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir en el mismo vector que el que codifica el ADN's de la proteína deseada, o puede estar codificado en un vector distinto que se introduce e integra simultáneamente en el genoma de la célula hospedadora, con frecuencia dando como resultado un enlace

físico estrecho entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables, que se pueden utilizar junto con el ADNc de la proteína deseada se basan en varias unidades de transcripción que codifican la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Después de la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44) éstas podrán crecer en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina ni glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir junto con unidades transcripcionales de ADNc de inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal en células CHO del tipo anterior, ya sea ligados en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de este modo líneas celulares positivas para dhfr que producen la proteína recombinante.

Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia del inhibidor de dhfr citotóxico metotrexato, surgirán nuevas líneas celulares resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante con una tasa mayor debido al número amplificado de dhfr enlazada y las unidades transcripcionales de la proteína deseada. Cuando estas líneas celulares se propagan en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas celulares que producen la proteína deseada con una tasa muy alta.

Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea en cultivo en suspensión o sobre diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microvehículos basados en matrices de dextrano o de colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando crece en un cultivo en suspensión celular o en microvehículos, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede realizar ya sea como un cultivo discontinuo o como un cultivo en perfusión, con una producción continua de medio acondicionado, durante periodos de tiempo prolongados. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy adecuadas para el desarrollo de un proceso industrial para la producción de las proteínas recombinantes deseadas.

La proteína recombinante, que se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar por una variedad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo métodos que utilizan diferencias en el tamaño, la carga, la hidrofobicidad, la solubilidad, la afinidad específica, etc., entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

Un ejemplo de una purificación de este tipo es la adsorción de la proteína recombinante a un anticuerpo monoclonal o a un péptido de unión, que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de la desorción, la proteína se puede purificar adicionalmente a través de una variedad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores.

Expresión en sistemas de expresión de levadura

Los géneros ejemplares de levadura contemplados por ser útiles como hospedadores en la práctica de la presente invención, son *Pichia* (anteriormente clasificada como *Hansenula*), *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Humicola*, *Mucor*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryosacculus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis* y similares. Los géneros incluyen los seleccionados a partir del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora*. Ejemplos de *Saccharomyces* spp. son *S. cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*.

Los promotores adecuados para *S. cerevisiae* incluyen aquellos relacionados con el gen *PGK1*, los genes *GAL1* o *GAL10*, *CYC1*, *PHO5*, *TRP1*, *ADHI*, *ADH2*, los genes para la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la triosa fosfato isomerasa, la isomerasa de fosfoglucoasa, la glucocinasa, la feromona del factor de apareamiento alfa, el promotor *PRB1*, *GUT2*, *GPDI* y promotores híbridos que implican híbridos de partes de regiones reguladoras 5' con partes de regiones reguladoras 5' de otros promotores o con sitios de activación aguas arriba (por ejemplo, el promotor del documento EP-A-258 067).

Los promotores regulables convenientes para uso en *Schizosaccharomyces pombe* son el promotor que se puede inhibir con tiamina procedente del gen *nmt*, tal y como describe Maundrell (Maundrell K. 1990. *Nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine*. J. Biol. Chem. 265:10857-10864) y el promotor del gen *jbpl* que se puede inhibir con glucosa, tal y como describen Hoffman y Winston (Hoffman CS y Winston F. 1990. *Isolation and characterization of mutants constitutive for expression of the fbp1 gene of Schizosaccharomyces pombe*. Genetics 124:807-816).

La señal de terminación de la transcripción puede ser la secuencia 3' flanqueante de un gen eucariótico que contiene señales apropiadas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Secuencias 3' flanqueantes adecuadas pueden ser, por ejemplo, aquellas con el gen unido de forma natural a la secuencia de control de la expresión empleada, es decir, pueden corresponder al promotor. Alternativamente, pueden ser diferentes en cuyo caso la señal de terminación del gen *ADHI* de *S. cerevisiae* se utiliza opcionalmente.

Expresión en sistemas de expresión bacterianos

Los sistemas de expresión ejemplares para la producción de los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados de la invención en bacterias, incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Caulobacter crescentus* y, lo más importante, *Escherichia coli* BL21 y *E. coli* K12 y sus derivados. Los promotores convenientes incluyen, pero no se limitan al promotor trc, el promotor tac, el promotor lac, el promotor del fago lambda p_L, el promotor araBAD inducible con L-arabinosa, el promotor rhaP inducible con L-ramnosa y el promotor/operador tetA inducible con anhidrotetraciclina.

En una realización, los polinucleótidos que codifican la infestina y los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados de la invención se pueden fusionar con secuencias señal que dirigirán la localización de una proteína de la invención a compartimentos particulares de una célula procariota y/o dirigirán la secreción de una proteína de la invención desde una célula procariota. Por ejemplo, en *E. coli*, se puede desear dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásmico. Ejemplos de secuencias señal o proteínas (o fragmentos de las mismas) a las que se pueden fusionar las proteínas de la invención con el fin de dirigir la expresión del polipéptido al espacio periplásmico de las bacterias incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal *pe/B*, la secuencia señal de la proteína que se une a maltosa, la secuencia señal *ompA*, la secuencia señal de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* periplásmica y la secuencia señal de la fosfatasa alcalina. Varios vectores están disponibles comercialmente para la construcción de proteínas de fusión que dirigirán la localización de una proteína, tales como la serie de vectores pMAL (New England Biolabs).

Expresión en células vegetales

Sistemas vegetales a modo de ejemplo para la expresión de los inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados de la invención incluyen tabaco, patata, arroz, maíz, soja, alfalfa, tomate, lechuga y leguminosas (resumidos por Ma JKC et al. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat. Rev. Genet. 4:794-805). La expresión de proteínas recombinantes en sistemas vegetales puede estar dirigida por elementos reguladores adecuados para órganos o tejidos específicos, tales como frutas, semillas, hojas o tubérculos. Alternativamente, las proteínas pueden ser secretadas desde las raíces. Dentro de la célula, las proteínas se pueden dirigir a determinados compartimentos, por ejemplo, el retículo endoplasmático, cuerpos proteicos o plastidios. Allí, el producto se puede acumular a niveles superiores o someter a formas particulares de modificación postraduccional.

Expresión transgénica

Ejemplos ilustrativos de sistemas de expresión transgénicos a gran escala (para una revisión véase Pollock DP. 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. J Immunol Methods 231:147-157) incluyen conejo (Chrenek P et al. 2007. Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits. Transgenic Res. 2007 Jan 31), cabra (Lazaris A et al. 2006. Transgenesis using nuclear transfer in goats. Methods Mol Biol. 348:213-26), cerdo y vaca.

Purificación y formulación terapéutica

Se prefiere purificar el inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal de la presente invención con una pureza superior al 80%, más preferiblemente una pureza superior al 95% y particularmente preferido es un estado farmacéuticamente puro que tiene una pureza superior al 99,9%, con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y está exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, un inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal aislado o purificado de la invención está sustancialmente exento de otros polipéptidos.

La presente invención proporciona el uso de un inhibidor de este tipo descrito en esta memoria, en la medicina; y también el uso de un inhibidor de este tipo en la preparación de un medicamento. Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende este inhibidor, que es adecuado para inhibir la activación del factor XII o la actividad del factor XIIa y que evita la formación y/o la estabilización de trombos arteriales o venosos tridimensionales.

Los polipéptidos terapéuticos descritos en esta invención se pueden formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. Las proteínas purificadas se pueden disolver en soluciones de tampón acuoso convencionales, fisiológicamente compatibles, a las que se puede añadir opcionalmente excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales vehículos y excipientes farmacéuticos, así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o en forma soluble estable. El polipéptido se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se administran al individuo por cualquier medio de administración farmacéuti-

amente adecuado. Se conocen diversos sistemas de entrega y se pueden usar para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Preferentemente las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para el uso sistémico, las proteínas terapéuticas de la invención se formulan para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o entérica (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. La ruta de administración más preferida es la administración intravenosa. Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión o mediante inyección en bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

Los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes y agentes humectantes, etc. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes, elixires o similares, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado para el uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes.

Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, geles o, preferiblemente, pomadas en emulsión. Las formulaciones útiles para la aplicación por pulverización pueden estar en forma de un líquido pulverizable o un polvo seco.

Los polipéptidos inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente efectiva, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la propagación de la afección o indicación que se está tratando, sin alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores, tales como por ejemplo, la indicación, la formulación y el modo de administración y se tiene que determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte de la misma composición farmacéutica.

Los diversos productos de la invención son útiles como medicamentos. Por consiguiente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal como se describe en el presente documento, un polinucleótido de la invención o un plásmido o un vector de la invención.

Los ADNs modificados de esta invención también se pueden integrar en un vector de transferencia para uso en la terapia génica humana.

La naturaleza, el beneficio y características adicionales de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de los experimentos realizados y sus resultados, cuando se considera junto con las figuras adjuntas descritas a continuación.

Figuras:

Figura 1: Modelo de trombosis patógena como describe Colman (Colman RW. 2006. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? J. Exp. Med. 203:493-495).

Figura 2: Similitud de la secuencia de aminoácidos entre infestina-4 (I4) y SPINK-1 (SP) *, aminoácidos idénticos; |, aminoácidos similares.

Figura 3: Los sitios de contacto del inhibidor *R. prolixus* con trombina se indican con # y los sitios de contacto de SPINK-1 con quimotripsina con +.

Figura 4: Secuencias de aminoácidos de infestina-4, SPINK1 y tres mutantes de SPINK1 (K1 - K3); * indica aminoácidos idénticos; | aminoácidos similares con respecto a la secuencia de infestina-4. La secuencia subrayada de I4 se utilizó para reemplazar 15 aminoácidos de SPINK-1 para generar el mutante K1. Los mutantes K2 y K3 se generaron por mutaciones puntuales adicionales (aminoácidos subrayados) sobre la secuencia de K1.

Figura 5: Efecto de la rHA-infestina-4 *in vitro* sobre el TTPa y la actividad de FXII en plasma de ratón.

Figura 6: Prolongación del TTPa después de 100 y 200 mg/kg de rHA-infestina-4 (i.v.) en ratones (antes de la administración y) hasta 4,5 horas.

Figura 7: Inhibición de FXII después de 100 y 200 mg/kg de rHA-infestina-4 (i.v.) en ratones (antes de la administración y) hasta 4,5 horas.

Figura 8: Evolución temporal de la rHA-infestina-4 en plasma de ratón después de una inyección i.v. de 100 mg/kg (media; n=1-2/punto temporal).

Figura 9: Comparación de la farmacocinética de (His)6-infestina y rHA-infestina-4 en ratones.

Figura 10: Efecto de rHA-infestina-4 sobre el tiempo hasta la hemostasia (n = 10-15/grupo, media $\pm$ DE).

Figura 11: Efecto de rHA-infestina-4 sobre la pérdida total de sangre (n = 10-15/grupo, media $\pm$ DE).

Figura 12: Efecto de rHA-infestina-4 sobre el tiempo hasta la hemostasia (n = 10-15/grupo, datos individuales).

Figura 13: Efecto de rHA-infestina-4 sobre la pérdida total de sangre (n = 10-15/grupo, datos individuales).

5 Ejemplos:

Ejemplo 1: Clonación de infestina-4, SPINK-1 e inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal modificados

La secuencia de aminoácidos de SPINK-1 se volvió a traducir en una secuencia de ADNc optimizada para la expresión en células de mamífero e incluyendo sitios de restricción adecuados. Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de SPINK que se iban a generar (véase la figura 4), que incluían el péptido señal natural de SPINK-1, se dividieron en 3 segmentos, cada uno de los cuales se sintetizó a medida mediante superposición de oligonucleótidos (Medigenomix, Martinsried, Alemania). Se generaron dos variantes de los segmentos 2 y 3, respectivamente y se ensamblaron de la siguiente manera:

S1 + S2wt + S3wt daba como resultado SPINK-1 de tipo silvestre

S1 + S2K1 + S3wt daba como resultado SPINK-K1

S1 + S2K1 + S3K3 daba como resultado SPINK-K3

Las secuencias de nucleótidos de segmentos se proporcionan como SEQ ID NO 7 a 11 (S1, SEQ ID NO 7; S2wt, SEQ ID NO 8; S2K1, SEQ ID NO 9; S3wt, SEQ ID NO 10; S3K3, SEQ ID NO 11).

El ensamblado de los segmentos se realizó del modo siguiente. Los segmentos, obtenidos a partir de Medigenomix en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen), se cortaron con las endonucleasas de restricción EcoRI/NarI (S1), NarI/KpnI (S2wt y S2K1) y KpnI/BamH1 (S3wt y S3K3), respectivamente, se aislaron a partir de geles de agarosa y se ligaron en el vector de expresión pRESpuo3 digerido con EcoRI/BamH1 (BD Biosciences) con las siguientes combinaciones:

a) S1 EcoRI/NarI + S2wt NarI/KpnI + S3wt KpnI/BamH1

b) S1 EcoRI/NarI + S2K1 NarI/KpnI + S3wt KpnI/BamH1

c) S1 EcoRI/NarI + S2K1 NarI/KpnI + S3K3 KpnI/BamH1

dando como resultado los plásmidos p1171 (a), p1172 (b) y p1174 (c), respectivamente.

Para generar la secuencia de SPINK-K2, el plásmido p1174 se sometió a una reacción de mutagénesis dirigida al sitio con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) usando los oligonucleótidos We2450 y We2451 (SEQ ID NO 12 y 13) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El plásmido resultante se denominó p1173.

La secuencia de infestina-4 se ensambló a partir de p1174 (la parte N-terminal de SPINK-K3) y la secuencia que codificaba la parte C-terminal (fragmento I4C, SEQ ID NO 14), que se sintetizó a medida mediante la superposición de oligonucleótidos (Medigenomix, Martinsried, Alemania). En primer lugar, el fragmento EcoRI/BamH1 que contenía la secuencia que codificaba el extremo N-terminal de SPINK-K3 se aisló de p1174 y se clonó en un pRESpuo3 linealizado con EcoRI/BamH1. El plásmido resultante se dirigió posteriormente con BamH1 y NotI y se insertó un fragmento BglII/NotI aislado a partir del vector pCR2.1 que contenía la secuencia que codificaba el fragmento I4C (suministrada por Medigenomix). El plásmido resultante denominado p1288 contenía entonces la secuencia que codificaba infestina-4.

Para fines de purificación se construyó un vector de expresión fijando un marcador de hexahistidina a infestina-4. Para ello se realizó una mutagénesis mediante inserción utilizando un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) según las condiciones descritas por el fabricante del kit, utilizando p1288 como molde y los oligonucleótidos We2973 y We2974 (SEQ ID NO 26 y 27) como cebadores mutagénicos. El plásmido resultante se denominó p1481 el cual codificaba una secuencia de infestina-4 con una extensión C-terminal de un enlazador de 8 aminoácidos de glicina/serina y un segmento de 6 residuos de histidina (SEQ ID NO 28).

Ejemplo 2: Clonación de estructuras artificiales de fusión con albúmina

En primer lugar, la secuencia de ADNc de albúmina humana, se clonó en el sitio EcoRI de pRESpuo3 (BD Biosciences), se mutagenizó por mutagénesis dirigida al sitio con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) usando los oligonucleótidos We2467 y We2468 (SEQ

ID NO 15 y 16) para eliminar el codón de parada y para introducir una primera parte de un enlazador de glicina/serina y un sitio de restricción BamH1 para la inserción de las secuencias de SPINK y infestina-4. El plásmido resultante se denominó p1192. Las secuencias que codificaban SPINK (sin péptido señal) se amplificaron mediante PCR usando p1171, p1172, p1173 y p1174 como moldes y los oligonucleótidos We2470 y We2473 (SEQ ID NO 17 y 18) que introducían la parte restante del enlazador de glicina/serina y un sitio BamH1 en el extremo 5' y un sitio NotI en el extremo 3' como cebadores. Se digirieron los fragmentos de PCR con BamHI/NotI, se purificaron y se insertaron en p1192, también cortado con BamHI/NotI. El plásmido resultante de la fusión con albúmina p1187 contenía SPINK-1 de tipo silvestre fusionado a la albúmina, p1188 SPINK-K1 fusionado a la albúmina, p1189 SPINK-K2 fusionado a la albúmina y p1190 SPINK-K3 fusionado a la albúmina. Del mismo modo se construyó el plásmido de expresión de infestina-4 y albúmina, pero en su lugar se utilizaron los cebadores We2473 y We2623 (SEQ ID NO 18 y 19) en p1288. El plásmido de expresión resultante se denominó p1290. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas se proporcionan como SEQ ID NO 20, 21, 22, 23 y 24, respectivamente.

Ejemplo 3: Transfección y expresión de infestina-4 marcada con His y de proteínas de fusión de infestina-4 y SPINK y albúmina en cultivos celulares de mamíferos

Los plásmidos de expresión se cultivaron en *E. coli* TOP10 (Invitrogen) y se purificaron utilizando protocolos convencionales (Qiagen). Las células HEK-293 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 4 µg/ml de puromicina. Las poblaciones de células transfectadas se propagaron a través de matraces T en botellas de rodillos o fermentadores a pequeña escala a partir de los cuales se recogieron los sobrenadantes para la purificación. Los rendimientos de la expresión en células HEK-293 eran de entre 6 y 15 µg/ml para las proteínas de fusión con albúmina y aproximadamente de 0,5 a 1 µg/mL FILR para la infestina-4 marcada con His.

Ejemplo 4: Expresión de infestina-4 marcada con His y de proteínas de fusión de infestina-4 y albúmina en levadura

Secuencias que codificaban infestina-4 marcada con His y proteínas de fusión de infestina-4 y albúmina se transfirieron a vectores de expresión adecuados para la expresión en *S. cerevisiae* como describen Invitrogen, MoBiTec o Novozymes Biopharma. La expresión de cultivos en matraces de agitación usando medio de crecimiento convencional, dio como resultado rendimientos de expresión entre 30 y 50 µg/ml para la proteína de fusión con albúmina y de aproximadamente 1 a 5 µg/mL para la infestina-4 marcada con His según se estimó a partir del análisis SDS PAGE después de la tinción con Coomassie.

Ejemplo 5: Purificación de las proteínas de fusión de inhibidor de Kazal-albúmina

Se concentraron 25 L de material sobrenadante del cultivo celular filtrado con 0,2 µm hasta un volumen de 1 L por ultrafiltración (10 kDa de tamaño de exclusión) y, posteriormente, se diafiltraron frente a Tris/HCl 40 mM pH 7,5 y otra vez se filtraron con 0,2 µm. El concentrado en bruto se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico empleando POROS 50 PI (26 x 750). La columna se equilibró con Tris/HCl 40 mM pH 7,5. Después de cargar 15 volúmenes de columna (VC) se realizó una etapa de lavado. El producto se eluyó en un gradiente lineal durante 35 VC hasta Tris/HCl 40 mM, cloruro de sodio 1200 mM pH 7,5. La proteína de fusión que contenía las fracciones se reunió y se concentró por ultrafiltración. Una diafiltración frente a una solución fisiológica de cloruro sódico dio lugar a un producto con una pureza de aproximadamente el 90% con una concentración de aproximadamente 15 mg/mL.

La purificación y la detección de la infestina-4 marcada con His se puede llevar a cabo mediante el uso de kits disponibles comercialmente (por ejemplo, His-tag Purification and Detection Kit; Qiagen, Hilden, Alemania), que contienen una resina Ni-NTA para la purificación y anticuerpos PentaHis para la detección de proteínas marcadas con His.

Ejemplo 6: Caracterización bioquímica de las proteínas de fusión de inhibidor de Kazal-albúmina

Determinación de la identidad/pureza:

La identidad/pureza de la proteína se determinó por SDS-PAGE (8-16%) utilizando un procedimiento convencional (Novex). La tinción se realizó con azul de Coomassie.

Concentración de proteína:

La concentración de proteína de una proteína de fusión con albúmina se determinó utilizando un ELISA específico de albúmina, cuya ejecución principal es conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, las microplacas se incubaron con 120 µL por pocillo de anticuerpo de captura (IgG de conejo anti-albúmina humana, DAKO A0001) diluido 1:14000 en tampón A (Sigma C-3041) durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma T-9039), cada pocillo se incubó con 200 µL de tampón C (Sigma T-8793) durante una hora a temperatura ambiente. Después de otras tres etapas de lavado con tampón B, diluciones en serie de las muestras del ensayo en tampón B, así como diluciones en serie de N Protein Standard SL (Dade Behring, 0,5 - 100 ng/ml) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL) se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, 100 µL de una dilución 1:12500 en tampón B del anti-

cuerpo de detección (de conejo anti-albúmina humana, DAKO P0356, marcado con peroxidasa) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante otra hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución de sustrato (TMB, Dade Behring, OUVF) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de solución de parada (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para una lectura en un lector de microplacas adecuado, a 450 nm de longitud de onda. Las concentraciones de las muestras del ensayo se calcularon después usando la curva estándar con N Protein Standard como referencia.

Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada

El tiempo de tromboplastina parcial activada se determinó en plasma humano estándar (del inglés, Standard Human Plasma, SHP, Dade Behring), al que se añadieron diferentes cantidades del inhibidor respectivo en un tampón de imidazol con un volumen total de 200 µL. Se añadieron 50 µL de esta solución a 50 µL de Pathromtin SL (Dade Behring) y se incubaron durante 120 segundos a 37°C. Posteriormente, se añadieron 50 µL de una solución de cloruro de calcio (25 mM) para iniciar la reacción.

El procedimiento se realizó en un BCT (del inglés, Behring Coagulation Timer) de acuerdo con las condiciones sugeridas por el fabricante.

Determinación del tiempo de protrombina:

El tiempo de protrombina se determinó en plasma humano estándar (Dade Behring), el reactivo de activación era Thromborel S (Dade Behring). Se añadieron 100 µL de Thromborel S a 50 µL de la muestra (véase más arriba) después de un tiempo de incubación de 15 s. El procedimiento se realizó en un BCT (Behring Coagulation Timer) de acuerdo con las condiciones sugeridas por el fabricante.

Resultados:

Tabla 2: Actividad de infestina-4 y de fusiones de mutante de SPINK y albúmina *in vitro*

	pmol	TTPa [s]	TP [s]	Pureza***
rHA-Infestina-4 ¹	4000**	102	13,4	85 %
	6000**	>240	14,2	
rHA-SPINK-K3 ²	2600****	43	12,6	90 %
	6500****	60	13,1	
	13000****	99	13,9	
rHA-SPINK-K2 ³	3000****	51	13,0	>90 %
* volumen del ensayo 200 µL: 150 µL de plasma humano estándar + 50 µL de imidazol ** determinado por ELISA específico de albúmina *** estimado por SDS-PAGE **** determinado mediante DO 280, ε [%] = 6,67 1,2,3 obtenidos a partir de ¹ p1290, ² p1190 y ³ p1189				

Estos experimentos muestran que los inhibidores de tipo Kazal son capaces de inhibir la vía intrínseca casi sin impacto sobre la vía extrínseca expresado por el TP casi constante.

Ejemplo 7: La fusión de infestina-4 y albúmina es altamente eficaz en la prevención de la oclusión de los vasos en un modelo de ratón para trombosis arterial

Para estimar la dosis requerida para lograr una protección fuerte de los ratones contra la trombosis arterial, se realizaron experimentos de adición *in vitro* con muestras enriquecidas. La adición de rHA-infestina-4 al plasma de ratón dio como resultado una disminución de la actividad de FXII y una prolongación del TTPa, mientras que el TP se mantuvo prácticamente sin cambios.

Tabla 3: Efecto de la rHA-Infestina-4 añadida al plasma de ratón sobre el TTPa y la actividad de FXII

Concentración de rHA-infestina-4 [mg/mL]	TTPa [s]	Actividad de FXII [% de la norma]
0	28,5	97,3
0,5	38,0	39,8
1,25	44,7	17,0

Concentración de rHA-infestina-4 [mg/mL]	TTPa [s]	Actividad de FXII [% de la norma]
2,5	65,6	8,5
5	95,7	5,6
10	no determinado	2,3

Tabla 4: Efecto de rHA-infestina-4 añadida al plasma de ratón sobre el TP y la actividad de FXII

Concentración de rHA-infestina-4 [mg/mL]	TP [s]	Actividad de FXII [% de la norma]
0	10,6	71,5
3,3	10,1	12,0

- 5 Como se observó una inhibición muy pronunciada de FXII después de una adición de plasma de ratón *in vitro*, los ratones fueron tratados i.v. con rHA-infestina-4 y se evaluó el curso del TTPa y la actividad de FXII (figuras 6 y 7). Además, los niveles plasmáticos de rHA-infestina-4 se determinaron en los puntos de tiempo especificados en la Tabla 5.

Tabla 5: Efecto de rHA-infestina-4 sobre el TTPa y la actividad de FXII

Tratamiento	t [min]	TTPa [s]	Actividad de FXII [% de la norma]	rHA-Infestina-4 [µg/mL]
rHA-Infestina-4, 100 mg/kg	0	26,0	69,9	<0,04
	5	54,6	n.d.	n.d.
	15	38,0	31,6	1399,3
	30	47,8	22,6	1077,8
	60	54,9	22,5	934,4
	270	45,8	29,9	499,4
rHA-Infestina-4, 200 mg/kg	60	54,6	38,0	1847
	120	42,5	35,9	1245,9
rHA-Infestina-4, 2 × 100 mg/kg	150	64,0	22,0	1189,3
rHA-Infestina-4, 400 mg/kg	30	49,4	12,6	n.d.
	90	44,8	27,5	n.d.
rHA-Infestina-4, 800 mg/kg	30	52,1	11,1	n.d.
	90	36,0	28,2	n.d.

- 10 Estos experimentos mostraron que con una sola inyección i.v. de 400 mg/kg de rHA-infestina-4, el TTPa se prolongaba y la actividad de FXII se reducía durante al menos una hora. Una sola inyección, por lo tanto, debe ser capaz de proteger a los ratones de una oclusión trombótica de los vasos en el modelo de FeCl₃ de trombosis. Por consiguiente, los animales fueron tratados con 400 mg/kg de rHA-infestina-4 i.v. y la tasa de oclusión de los vasos se determinó, así como el tiempo hasta que se produjo la oclusión.
- 15 Los animales recibieron rHA-infestina-4 a través de una sola inyección i.v. con una dosis de hasta 400 mg/kg en t = 0. Para la evaluación de la trombosis arterial abdominal, la arteria se puso al descubierto bajo anestesia general. El flujo sanguíneo de línea de base se determinó mediante la colocación de una sonda de flujo ultrasónico alrededor del vaso. Para iniciar la trombosis, se colocó un parche de 0,5 mm² de papel de filtro, que se había saturado con solución de cloruro férrico al 10%, en la arteria abdominal, aguas abajo de la sonda de flujo. Después de un período de exposición de 3 minutos, el papel de filtro se eliminó y el flujo sanguíneo se controló durante 60 minutos para determinar la aparición de oclusiones trombóticas.
- 20

La Tabla 6 muestra que el 82 % de los animales tratados con vehículo mostraba trombosis. Por el contrario, ninguno de los 10 ratones tratados con rHA-Infestina-4 desarrolló trombosis. Este efecto era dependiente de la dosis e inverso a la disminución de la incidencia de la oclusión, el tiempo hasta que se incrementó la aparición de oclusión.

Tabla 6: Tasa de oclusión trombótica después de un solo tratamiento i.v. con un máximo de 400 mg/kg de rHA-infestina-4

Nº	Tratamiento	n	Tasa de oclusión	Tiempo hasta la oclusión [min; media±DE]
1	Solución salina isotónica	21	19 (91%)	10,1 ± 3
2	rHA-Infestina-4 50 mg/kg	10	7 (70%)	15,0 ±7,6
3	rHA-Infestina-4 93,2 mg/kg	10	2 (20%)	23,5 ±12,0
4	rHA-Infestina-4 186,3 mg/kg	10	1 (10%)	48,0 ±0,0
5	rHA-Infestina-4 400 mg/kg	10	0 (0%)	no aplicable (no tuvo lugar oclusión)

Como los animales k.o. para FXII están protegidos de una manera similar contra la trombosis, pero en paralelo no se observa una falta de hemostasia, la hemostasia se analizó de una manera similar en los ratones tratados por vía intravenosa con hasta 400 mg/kg de rHA-infestina-4. Para este propósito, los animales fueron anestesiados con Narcoren a través de una sola inyección i.v. de aproximadamente 60 mg/kg. La rHA-infestina-4 se inyecta 15 minutos antes de la lesión del animal, es decir, en el mismo momento y con la misma dosis que en el experimento para evaluar sus efectos antitrombóticos.

La hemostasia se cuantificó mediante la determinación del tiempo hasta la hemostasia y la pérdida de sangre hasta la aparición de la hemostasia, siendo la exclusión el final del período de 30 minutos de observación. El volumen de la pérdida total de sangre se calculó midiendo la HGB presente en la solución salina utilizada para la inmersión de la punta de la cola. La HGB de los animales se tomó en consideración en consecuencia. Se realizó el corte de la punta de la cola con un escalpelo bajo anestesia general, cortando aproximadamente 3 mm de la punta de la cola. Inmediatamente después de la lesión, la punta de la cola se sumergió en una solución salina precalentada que también se mantuvo a la temperatura corporal fisiológica de los ratones, empleando un baño de agua durante el periodo de observación. El periodo de observación para controlar la hemorragia fue de 30 min. Todos los productos del ensayo se administraron por vía i.v. 15 min antes del comienzo del periodo de observación (cola cortada)

Todos los parámetros clave para la hemostasia en el período de observación, tiempo hasta la hemostasia y pérdida de sangre no mostraron diferencias obvias entre los dos grupos de tratamiento y el grupo control de vehículo (Tabla 7, 8, Figuras 10-13).

Tabla 7: Estadística descriptiva para la frecuencia y el tiempo hasta la hemostasia en 30 minutos (n = 10-15/grupo)

Tratamiento	Frecuencia de la hemostasia	Tiempo hasta la hemostasia			
		Media ±DE (s)	Mín (s)	Med. (s)	Máx. (s)
Vehículo	15/15 (100%)	165±176	80	100	660
rHA-Infestina-4 190 mg/kg	10/10 (100%)	114±77	50	83	240
rHA-Infestina-4 400 mg/kg	10/10 (100%)	115±35	80	100	180

Tabla 8: Estadística descriptiva para la pérdida de sangre (n=10-15/grupo)

Tratamiento	Media ±DE (pL)	Mín (µL)	Mediana (µL)	Máx. (µL)
Vehículo	9,6±7,4	1,4	8,1	23,7
rHA-Infestina-4 190 mg/kg	3,9±2,7	1,1	3,1	8,9
rHA-Infestina-4 400 mg/kg	16,1±14,3	2,6	11,9	49,1

La infestina-4 sola, es decir, sin haberse fusionado con la albúmina (por ejemplo, véase el ejemplo 1, infestina-4 marcada con His), se somete a ensayo para estudiar la protección potencial contra la trombosis. Una dosis aproximadamente equimolar a 400 mg/kg de rHA-infestina-4 se inyecta i.v. en los ratones una vez, 15 minutos antes de la inducción de la trombosis. La inducción y la evaluación de la trombosis se realizan de una manera idéntica a la descrita para la rHA-infestina-4. Para superar la eliminación rápida, la infestina-4 se aplica por infusión continua o inyecciones repetidas, un procedimiento convencional para lograr un alto nivel en plasma de compuestos que se van a aclarar rápidamente de la circulación o que van a perder actividad debido a diferentes mecanismos más que a razones farmacocinéticas.

Los resultados muestran que el grupo de ratones tratados con rHA-infestina-4 no muestra trombosis ni riesgo de

hemorragia, lo que coincide con el resultado (mostrado en otra parte) del grupo de ratones k.o. para FXII.

Ejemplo 8: Efectos de Berinert® P, inhibidor de FXII(a) disponible comercialmente, sobre el TTPa, el TP y la oclusión de los vasos en el modelo de FeCl₃ en rata de trombosis arterial

Con el fin de evaluar la idoneidad de Berinert® P, inhibidor de FXII(a) disponible comercialmente, (inhibidor de la esterasa C1) sobre su potencial para inhibir FXII(a), se realizaron varios experimentos *in vitro* e *in vivo*.

El objetivo de los experimentos era determinar los efectos sobre el TTPa y el TP, así como sobre la actividad de FXII en plasma de rata y evaluar los potenciales efectos antitrombóticos en un modelo de FeCl₃ en rata de trombosis arterial.

Las ratas se anestesiaron y se tomaron muestras de sangre de forma retroorbital y se procesaron a plasma para la determinación de la actividad del Factor XII, de acuerdo con procedimientos convencionales. A tales muestras de plasma se añadió Berinert® P y se sometieron a ensayo directamente para estudiar la actividad de FXII.

La adición de Berinert® P se sometió a ensayo para estudiar sus efectos sobre la actividad de FXII *in vitro*. En altas concentraciones, se observó una inhibición sustancial de FXII (tabla 9).

Tabla 9: Efecto de la adición de Berinert® P al plasma de rata sobre la actividad de FXII

Concentración de Berinert® P [U/mL]	Actividad de FXII [% de la norma]
0,98	215
2,4	94
4,5	85
9,92	55
16,7	25

Como se logró una inhibición significativa de FXII, se realizaron experimentos *in vivo*. Las ratas se trataron por vía i.v. con Berinert® P a una dosis de 1200 U/kg, con el fin de determinar el potencial de prevención de la trombosis. La dosis fue elegida para dar lugar a una concentración plasmática del 10-15 U/mL. Para la evaluación de la trombosis arterial, la arteria carótida y la vena yugular se pusieron al descubierto bajo anestesia general. Se insertó una cánula en la vena yugular para la administración del fármaco. Para controlar el flujo sanguíneo, una sonda de flujo ultrasónico se colocó alrededor de la arteria carótida. Para iniciar la trombosis, se colocó un parche de 2,5 mm² de papel de filtro, que se había saturado con solución de cloruro férrico al 35%, en la arteria carótida aguas abajo de la sonda de flujo. Después de un período de exposición de 3 minutos, el papel de filtro se eliminó y el flujo sanguíneo se controló durante 60 minutos para determinar la aparición de oclusiones trombóticas. El TTPa, el TP y la actividad de FXII se determinaron al final del período de observación.

El tratamiento de 3 min de la arteria carótida con cloruro férrico al 35% dio como resultado una tasa del 100% de oclusiones trombóticas (tabla 10). Aunque una dosis elevada de Berinert® P había dado lugar a un aumento del TTPa y una inhibición moderada de FXII, no se observó ningún efecto positivo sobre la tasa de oclusión.

Tabla 10: Tasas de oclusión

Nº	Tratamiento	n	Tasa de oclusión	TTPa [media±DE]	TP [media±DE]	Actividad de FXII [media±DE]
1	Solución salina isotónica	10	10(100%)	22 ± 4	11,7 ± 1,5	121 ± 9
2	Berinert® P	11	9 (82 %)	53 ± 9	12,0 ± 0,9	94 ± 14

Resumen:

Las altas concentraciones de Berinert® P dieron como resultado una inhibición pronunciada de FXII *in vitro*. Sin embargo, en el modelo de FeCl₃ de trombosis arterial, incluso una dosis alta de Berinert® P era ineficaz. Esta dosis de Berinert® P estaba cerca del límite técnico ya que la aplicación de dosis más elevadas habría dado lugar a una alta carga de proteína y a volúmenes de inyecciones no fisiológicas.

Ejemplo 9: Comparación de la farmacocinética de (His)6-infestina y rHA-infestina-4 en ratones

Las preparaciones de infestina-4 marcada con His ((His)6-infestina-4) o de fusiones de infestina-4 y albúmina (rHA-

infestina-4) se administraron por vía intravenosa hasta un total de 28 ratones NMRI. Para (His)6-infestina-4 la dosis era de 20 mg/kg de peso corporal y 200 mg/kg de peso corporal para rHA-infestina-4, respectivamente. Estas dosis se corresponden con una cantidad equivalente del componente activo de las dos proteínas, es decir, infestina-4.

- 5 Las muestras de sangre se extrajeron a intervalos apropiados, comenzando 5 minutos después de la aplicación de las sustancias del ensayo. El contenido en antígeno infestina-4 se cuantificó posteriormente mediante un ensayo ELISA específico para infestina-4. Los valores medios de los grupos de tratamiento se utilizaron para el cálculo. Las semividas para cada proteína se calcularon utilizando los puntos de tiempo de la fase beta de la eliminación, de acuerdo con la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, mientras que k es la pendiente de la recta de regresión. El resultado se representa en la Figura 9 ($n = 1-4$ /punto de tiempo; media).
- 10 La semivida terminal calculada para rHA-infestina-4 es de 3 h, mientras que la semivida terminal calculada para (His)6-infestina-4 es de 0,3 h. Por lo tanto, se muestra un claro aumento de la semivida terminal para la rHA-infestina-4 por un factor de 10, en comparación con ((His)6-infestina-4.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CSL Behring GmbH
- 15 <120> Aplicación terapéutica de inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal.
- <130> 2007_M001_A119
- <150> EP07002903.8
< 151> 2007-02-12
- <160> 25
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
< 211> 56
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens
- 25 <400> 1
Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys
1 5 10 15
Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro
20 25 30
Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile
35 40 45
Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
50 55
- 30 <210> 2
< 211> 53
< 212> PRT
< 213> Artificial
- <220>
< 223> Artificial

ES 2 566 385 T3

<400> 2

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys
20 25 30

Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Ser Gly Pro Cys
50

<210> 3

< 211> 53

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Artificial

<400> 3

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys
50

<210> 4

< 211> 54

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Artificial

<400> 4

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile
35 40 45

Gln Lys Glu Gly Pro Cys
50

<210> 5

< 211> 48

< 212> PRT

< 213> Triatoma infestans

ES 2 566 385 T3

<400> 5

Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys
1 5 10 15

Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn Pro Cys Met Leu Asn Cys Ala
20 25 30

Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys Leu Val His Glu Gly Arg Cys
35 40 45

<210> 6

<211> 585

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

ES 2 566 385 T3

<400> 6

```

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1      5      10      15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20      25      30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35      40      45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50      55      60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65      70      75      80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85      90      95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100     105     110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115     120     125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130     135     140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145     150     155     160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165     170     175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180     185     190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195     200     205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210     215     220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225     230     235     240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245     250     255

```

ES 2 566 385 T3

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

ES 2 566 385 T3

	<210> 7 < 211> 81 < 212> ADN < 213> Artificial	
5	<220> < 223> Artificial	
	<400> 7 gaattcgcca ccataaagg gaccggcatc ttctgctgt ccgccctggc cctgctgtcc ctgtccggca acaccggcgc c	60 81
10	<210> 8 < 211> 84 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> Artificial	
15	<400> 8 ggcgccgact ccctgggccc cgaggccaag tgctacaacg agctgaacgg ctgcaccaag atctacgacc ccgtgtgccc tacc	60 84
20	<210> 9 < 211> 75 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> Artificial	
	<400> 9 ggcgccgact ccctgggccc cgagggtgccc aaccctgccc cctgcttccc caactacgtg cccgtgtgccc gtacc	60 75
25	<210> 10 < 211> 105 < 212> ADN < 213> Artificial	
30	<220> < 223> Artificial	
	<400> 10 ggtaccgacg gcaacaccta ccccaacgag tgcgtgctgt gcttcgagaa ccgcaagcgc cagaccicca tcctgatcca gaagtcggc ccctgctgag gatcc	60 105
35	<210> 11 < 211> 108 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> Artificial	

ES 2 566 385 T3

	<400> 11 ggtaccgacg gcaacaccta cggcaacgag tgcattgctga actgcgccga gaaccgcaag cgccagacct ccattcctgat ccagaaggag ggcccctgct gaggatcc	60 108
5	<210> 12 < 211> 25 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Artificial	
10	<400> 12 cgagtgcattg ctgtgcgccg agaag	25
	<210> 13 < 211> 25 < 212> ADN < 213> Artificial	
15	<220> < 223> Artificial	
	<400> 13 gttctcggcg cacagcattg actcg	25
20	<210> 14 < 211> 107 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Artificial	
25	<400> 14 agattctgacg gaaagaccta cggcaacccc tgcattgctga actgtgccgc ccagaccaag gtgcccgggc tcaagctggt gcacgagggc cgtgtctagg cggccgc	60 107
30	<210> 15 < 211> 37 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Artificial	
	<400> 15 gctgccttag gcttaggagg atccagcgt gtgaagg	37
35	<210> 16 < 211> 37 < 212> ADN < 213> Artificial	
40	<220> < 223> Artificial	
	<400> 16 ccttcacagc gctggatcct cctaagccta aggcagc	37

ES 2 566 385 T3

<210> 17
 < 211> 29
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

5

<220>
 < 223> Artificial

<400> 17
 cgcgcggccg cgatcctcag caggggccg 29

10

<210> 18
 < 211> 42
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Artificial

15

<400> 18
 gcgggatccg gggggagcgg cggctccgac tccctgggcc gc 42

20

<210> 19
 < 211> 18
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Artificial

<400> 19
 ctgctggcgg ccgcctag 18

25

<210> 20
 < 211> 650
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 20
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

30

ES 2 566 385 T3

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

ES 2 566 385 T3

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 580 585 590
 Gly Ser Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn
 595 600 605
 Gly Cys Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr
 610 615 620
 Tyr Pro Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr
 625 630 635 640
 Ser Ile Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
 645 650

ES 2 566 385 T3

<210> 21
 < 211> 647
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 21
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

ES 2 566 385 T3

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

ES 2 566 385 T3

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 580 585 590

Gly Ser Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe
 595 600 605

Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn
 610 615 620

Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu
 625 630 635 640

Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
 645

<210> 22

< 211> 647

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

ES 2 566 385 T3

35	40	45
Phe Ala Lys Thr Cys Val 50	Ala Asp Glu Ser Ala 55	Glu Asn Cys Asp Lys 60
Ser Leu His Thr Leu 65	Phe Gly Asp Lys Leu 70	Cys Thr Val Ala Thr Leu 75 80
Arg Glu Thr Tyr 85	Gly Glu Met Ala Asp 90	Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro 95
Glu Arg Asn 100	Glu Cys Phe Leu Gln His 105	Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu 110
Pro Arg Leu Val Arg Pro 115	Glu Val Asp Val Met Cys Thr 120 125	Ala Phe His
Asp Asn Glu Glu Thr Phe 130	Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr 135 140	Glu Ile Ala Arg
Arg His Pro Tyr Phe 145	Tyr Ala Pro Glu Leu 150 155	Phe Phe Ala Lys Arg 160
Tyr Lys Ala Ala 165	Phe Thr Glu Cys Cys 170	Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala 175
Cys Leu Leu Pro 180	Lys Leu Asp Glu Leu Arg 185	Asp Glu Gly Lys Ala Ser 190
Ser Ala Lys 195	Gln Arg Leu Lys Cys Ala 200	Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu 205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp 210	Ala Val Ala Arg Leu 215 220	Ser Gln Arg Phe Pro
Lys Ala Glu Phe Ala 225	Glu Val Ser Lys Leu Val 230 235	Thr Asp Leu Thr Lys 240
Val His Thr Glu 245	Cys Cys His Gly Asp Leu 250	Leu Glu Cys Ala Asp Asp 255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr 260	Ile Cys Glu Asn Gln Asp 265 270	Ser Ile Ser
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys 275	Glu Lys Pro Leu Leu 280 285	Glu Lys Ser His
Cys Ile Ala Glu Val Glu 290	Asn Asp Glu Met Pro 295 300	Ala Asp Leu Pro Ser
Leu Ala Ala Asp Phe Val 305	Glu Ser Lys Asp Val Cys 310	Lys Asn Tyr Ala

ES 2 566 385 T3

305		310		315		320
Glu Ala Lys Asp Val	Phe Leu Gly Met	Phe Leu Tyr Glu Tyr	Ala Arg			
	325	330	335			
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val	Leu Leu Leu Arg Leu	Ala Lys Thr				
	340	345	350			
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys	Cys Cys Ala Ala Ala	Asp Pro His Glu				
	355	360	365			
Cys Tyr Ala Lys Val Phe	Asp Glu Phe Lys Pro	Leu Val Glu Glu Pro				
	370	375	380			
Gln Asn Leu Ile Lys	Gln Asn Cys Glu Leu	Phe Glu Gln Leu Gly	Glu			
	385	390	395	400		
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	Arg Tyr Thr Lys Lys Val	Pro				
	405	410	415			
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val	Glu Val Ser Arg Asn	Leu Gly Lys				
	420	425	430			
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys	His Pro Glu Ala Lys	Arg Met Pro Cys				
	435	440	445			
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val	Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His					
	450	455	460			
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr	Lys Cys Cys Thr Glu Ser					
	465	470	475	480		
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser	Ala Leu Glu Val Asp	Glu Thr				
	485	490	495			
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala	Glu Thr Phe Thr Phe	His Ala Asp				
	500	505	510			
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys	Glu Arg Gln Ile Lys	Lys Gln Thr Ala				
	515	520	525			
Leu Val Glu Leu Val Lys His	Lys Pro Lys Ala Thr	Lys Glu Gln Leu				
	530	535	540			
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala	Phe Val Glu Lys Cys Cys	Lys				
	545	550	555	560		
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala	Glu Glu Gly Lys Lys	Leu Val				
	565	570	575			
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly	Leu Gly Gly Ser Gly Gly	Ser Gly				

ES 2 566 385 T3

580

585

590

Gly Ser Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe
595 600 605

Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn
610 615 620

Glu Cys Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu
625 630 635 640

Ile Gln Lys Glu Gly Pro Cys
645

<210> 23

< 211> 648

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 23

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

ES 2 566 385 T3

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

ES 2 566 385 T3

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Ser Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe
595 600 605

Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn
610 615 620

Glu Cys Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile
625 630 635 640

Leu Ile Gln Lys Glu Gly Pro Cys
645

<210> 24

< 211> 647

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 24

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

ES 2 566 385 T3

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

ES 2 566 385 T3

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

ES 2 566 385 T3

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Ser Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe
595 600 605

Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn
610 615 620

Pro Cys Met Leu Asn Cys Ala Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys
625 630 635 640

Leu Val His Glu Gly Arg Cys
645

<210> 25

< 211> 294

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 25

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Pro
50 55 60

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
85 90 95

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
100 105 110

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
115 120 125

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
130 135 140

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
145 150 155 160

ES 2 566 385 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 165 170 175
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 180 185 190
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 195 200 205
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 210 215 220
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 245 250 255
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 260 265 270
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 275 280 285
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290

REIVINDICACIONES

1. Inhibidores de Kazal mutantes obtenidos a partir de SPINK-1, en donde dichos inhibidores tienen más de 20 aminoácidos idénticos a la infestina-4, o una sustitución conservadora en lugar de identidad, es decir, una sustitución conservadora en lugar de un aminoácido idéntico y que son adecuados para prevenir la formación y/o la estabilización de trombos arteriales o venosos tridimensionales y en donde dicho inhibidor se escoge entre el grupo que consiste en SPINK K1, K2 y K3 (SEQ ID NO 2, 3 y 4).
2. Inhibidores de Kazal mutantes según la reivindicación 1, en donde los inhibidores están ligados a polipéptidos que mejoran la semivida.
3. Los inhibidores según la reivindicación 2, caracterizados porque el polipéptido que mejora la semivida se obtiene a partir de un miembro de la familia de proteínas de la albúmina humana, es decir, albúmina, afamina, alfafetoproteína o proteína que se une a la vitamina D.
4. Los inhibidores según las reivindicaciones 2 o 3, caracterizados porque el polipéptido que mejora la semivida es albúmina humana o una variante o un dominio o una parte de la misma.
5. Los inhibidores según las reivindicaciones 2 o 4, caracterizados porque el polipéptido que mejora la semivida es una inmunoglobulina o una parte de la misma.
6. Los inhibidores según la reivindicación 5, caracterizados porque la parte de inmunoglobulina es una porción Fc de IgG.
7. Los inhibidores según las reivindicaciones 2 a 6, caracterizados porque los polipéptidos que mejoran la semivida están ligados al resto del inhibidor de Kazal a través de enlazadores, preferiblemente enlazadores escindibles.
8. Los inhibidores según la reivindicación 7, caracterizados porque los enlazadores son escindibles con proteasas de la coagulación de la vía intrínseca de la coagulación.
9. Los inhibidores según la reivindicación 8, caracterizados por enlazadores escindibles con FXIIa.
10. Un producto farmacéutico que comprende un inhibidor según las reivindicaciones 1 a 9 o que comprende una infestina o un fragmento de la misma.
11. Un inhibidor según las reivindicaciones 1 a 9 y/o una infestina o un fragmento de la misma para uso como medicamento.
12. Método para producir un inhibidor de Kazal mutante obtenido a partir de SPINK-1 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, a través de medios recombinantes en células eucariotas, bacterias, levaduras, células vegetales o de insecto o en animales transgénicos.

Figura 1:

Modelo de trombosis patógena como describe Colman
(Colman RW. 2006. Are hemostasis and thrombosis two
sides of the same coin? J. Exp. Med. 203:493-495).

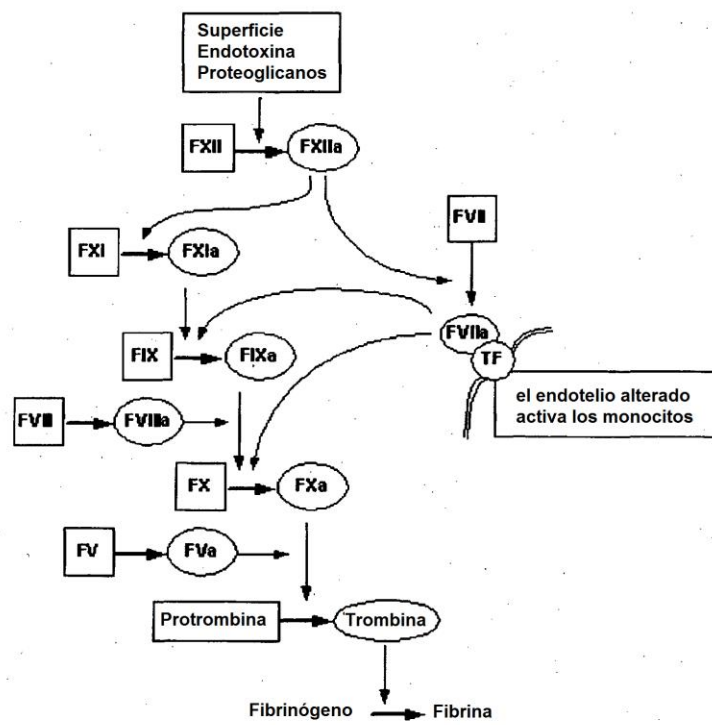


Figura 2:

Similitud de la secuencia de aminoácidos entre infestina-4 (I4) y SPINK-1 (SP)

*, aminoácidos idénticos; |, aminoácidos similares.

```

I4      EVRNP-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLV-HEGRC
      * | *      * | * * * * | * * * * * | * * | *      * *
SP: DSLGREAK--CYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQSGPC
  
```

Figura 3:

Los sitios de contacto del inhibidor de *R. prolixus* con trombina se indican con # y los sitios de contacto de SPINK-1 con quimotripsina con +.

	###	#####	# ##	# #
Rho	EGGEPC-----	ACPHALHRVCGSDGETY	SNPCTLNCAKFNGKPELVKVHDGPC	
I4	EVRNPC-----	ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLVHEGRC		
SP	GREAKCYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRTSILIQKSGPC			
	+++++		++ + +	

Figura 4:

Secuencias de aminoácidos de infestina-4, SPINK1 (SP) y tres mutantes de SPINK1 (K1 - K3); * indica aminoácidos idénticos; | aminoácidos similares con respecto a la secuencia de infestina-4. La secuencia subrayada de I4 se utilizó para reemplazar 15 aminoácidos de SPINK-1 para generar el mutante K1. Los mutantes K2 y K3 se generaron por mutaciones puntuales adicionales (aminoácidos subrayados) sobre la secuencia de K1.

```

I4      EVRNPC-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLV-HEGRC
SP: DSLGREAK--CYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQKSGPC
      * | *      * | * * * * | * * * * | * * | *      * *
K1: DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQKSGPC
      * * * * *      * * * * * * * * * * | * * * * | *      * | * *
K2: DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECML-CAENRKRQTSILIQKEGPC
      * * * * *      * * * * * * * * * * | * * * * * * * * | *      * *
K3: DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECMLNCAENRKRQTSILIQKEGPC
      * * * * *      * * * * * * * * * * | * * * * * * * * | *      * *
  
```

Figura 5:

Efecto de rHA-infestina-4 in vitro sobre el TTPa y la actividad de FXII en plasma de ratón.

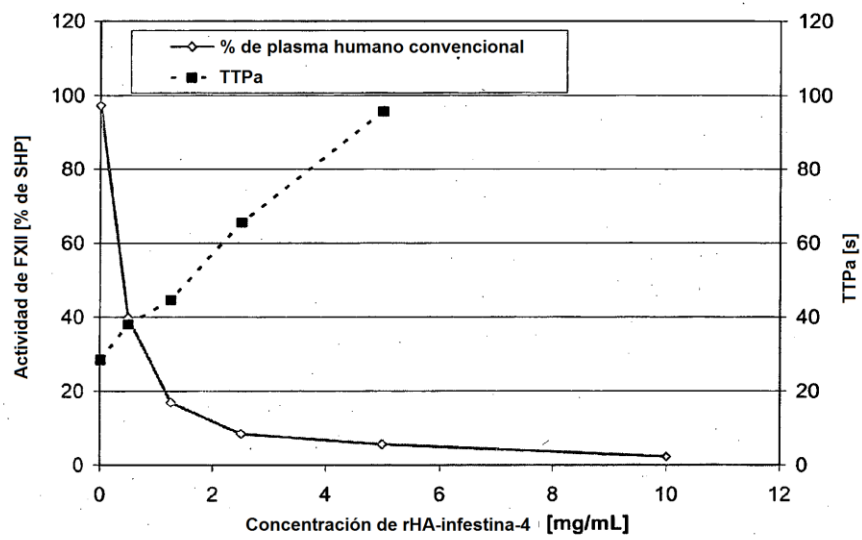


Figura 6:

Prolongación del TTPa después de la aplicación de 100 y 200 mg/kg de rHA-infestina-4 (i.v.) en ratones (antes de la administración y) hasta 4,5 horas.

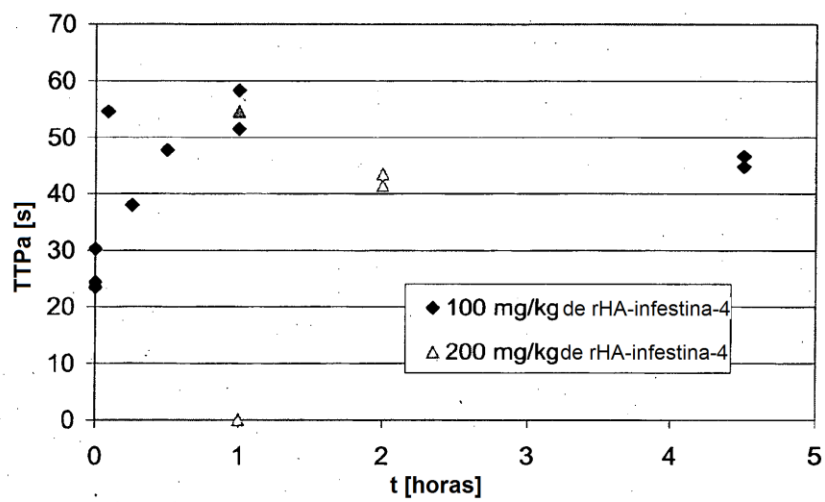


Figura 7:

Inhibición de FXII después de la aplicación de 100 y 200 mg/kg de rHA-infestina-4 (i.v.) en ratones (antes de la administración y) hasta 4,5 horas.

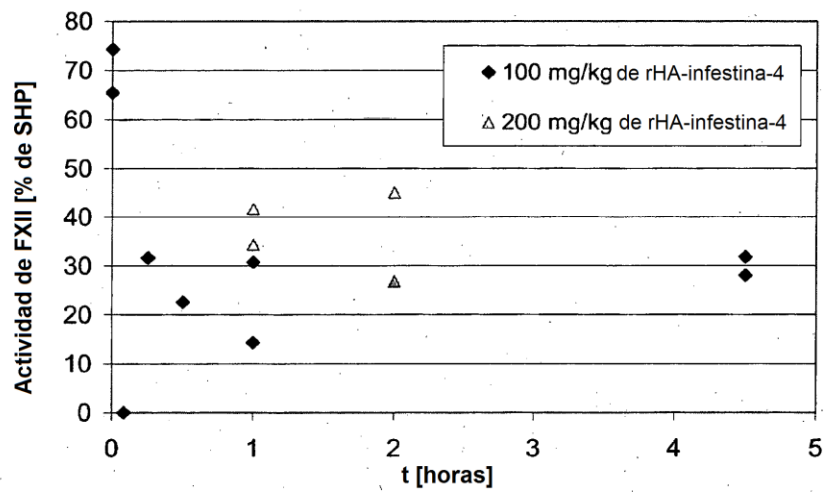


Figura 8:

Evolución temporal de rHA-infestina-4 en plasma después de una inyección i.v. de 100 mg/kg (media; n= 1-2/punto temporal).

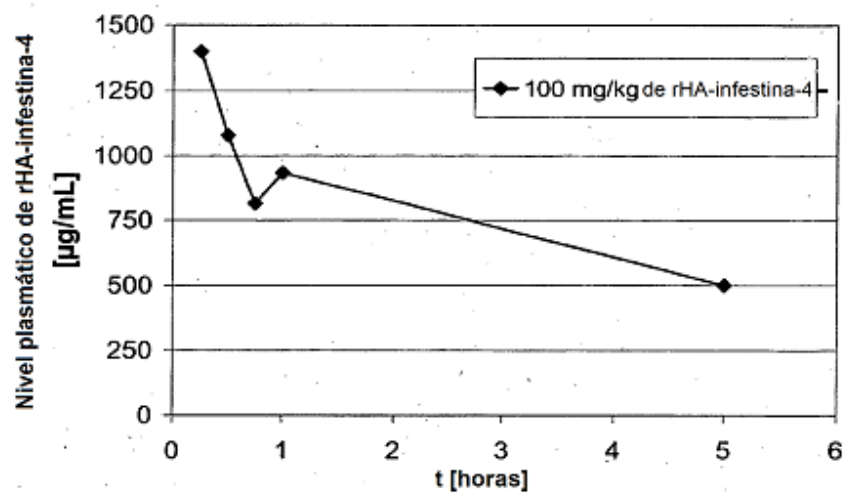


Figura 9:

Comparación de la farmacocinética de (His)6-infestina y rHA-infestina-4 en ratones.

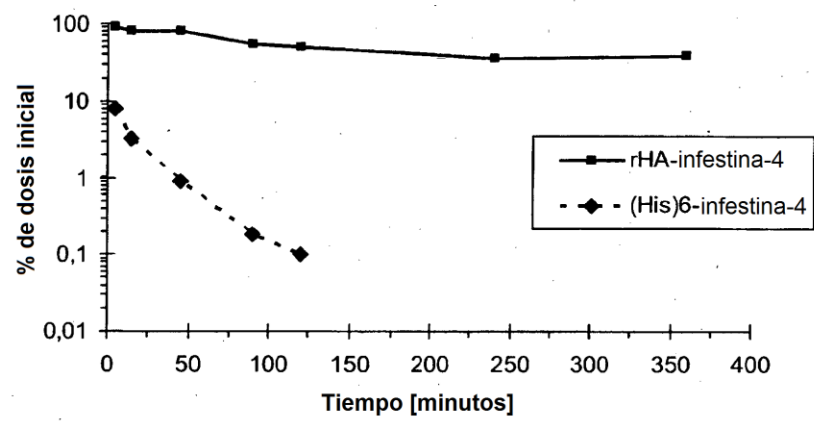


Figura 10:

Efecto de rHA-infestina-4 sobre el tiempo hasta la hemostasia (n=10-15/grupo, media $\pm$ DE).

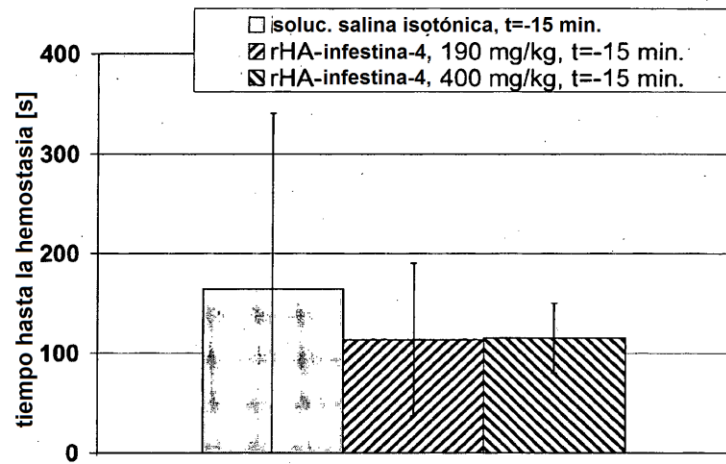


Figura 11:

Efecto de rHA-infestina-4 sobre la pérdida total de sangre
(n=10-15/grupo, media $\pm$ DE).

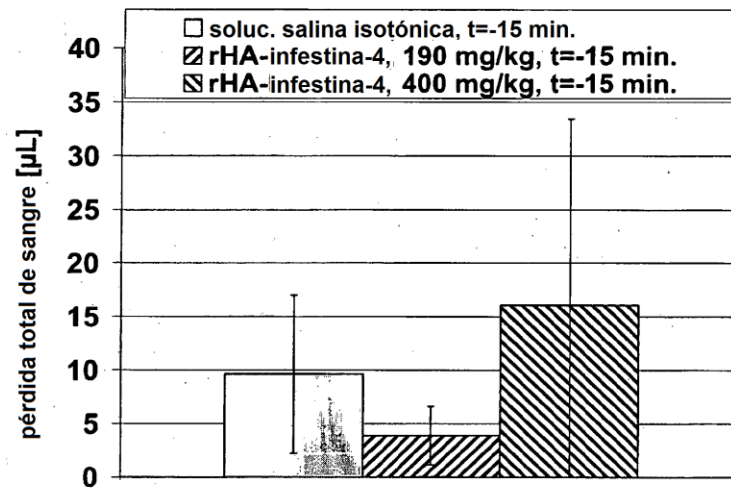


Figura 12:

Efecto de rHA-infestina-4 sobre el tiempo hasta la hemostasia (n=10-15/grupo, datos individuales).

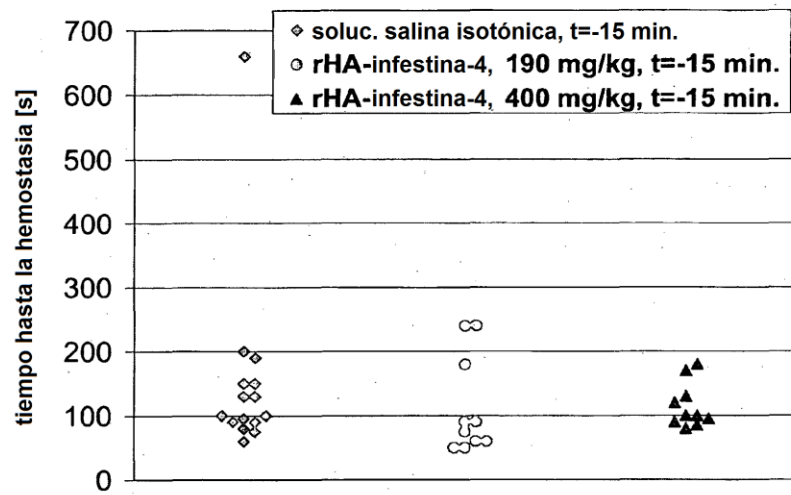


Figura 13:

Efecto de rHA-infestina-4 sobre la pérdida total de sangre
(n=10-15/grupo, datos individuales).

